

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA  
Diretor: Prof. Dr. Paulo M. G. de Lacerda Júnior

## OBSERVAÇÕES SOBRE O ISOLAMENTO DO *STREPTOCOCCUS EQUI* DE MATERIAL CONTAMINADO

(OBSERVATIONS ON THE ISOLATION OF *STREPTOCOCCUS EQUI*  
FROM POLLUTED MATERIAL)

D. C. DE FREITAS  
Assistente

LACERDA (1951) e LACERDA & FREITAS (1953) evidenciaram a vantagem do emprego do nitrogeneto de sódio ( $\text{Na N}_3$ ) em técnicas de isolamento de estreptococos hemolíticos de material retirado das narinas de eqüinos. Puderam demonstrar, também, que essa substância não possui propriedades estimulantes da multiplicação desses germes e que seu papel seletivo nos meios de cultura se deve à maior toxidez que apresenta frente aos outros microorganismos — principalmente os Gram negativos — que constituem a flora bacteriana habitual das fossas nasais dos eqüinos.

O nitrogeneto de sódio, em meios sólidos, já fôra empregado com sucesso em estudos bacteriológicos de mastite bovina desde que HARTMAN (1937) evidenciara suas qualidades de substância seletiva para estreptococos. A natureza do material estudado por LACERDA (1951) não permitia o emprego de meios sólidos adicionados de  $\text{Na N}_3$  porque havia necessidade de se emulsionar as amostras em meio líquido, para homogeneização. Daí haverem LACERDA & FREITAS (1952) preparado um meio que lhes forneceu ótimos resultados ao lado de uma fórmula relativamente simples:

Caldo simples .....	1.000 $\text{cm}^3$
Glicose .....	10 g
$\text{Na N}_3$ .....	0,5 g
Solução aquosa a 0,1% de cristal violeta *	2 $\text{cm}^3$

No intuito de prosseguir estudos sobre o *Streptococcus equi*, iniciá-mos novas investigações.

Desta vez, porém, resolvemos trabalhar com o meio “SF Medium” (B 315), preparado por “Difco Laboratories Inc.”. Tal meio não é re-

---

\* EDWARDS (1933) e PACKER (1942) ressaltaram o valor do cristal violeta no isolamento de estreptococos.

comendado particularmente para o isolamento de *St. equi*, mas sua fórmula nos pareceu adequada para tal fim.

Após verificarmos que tanto o *Streptococcus equi* como o *Streptococcus zooepidemicus* (essas duas espécies são as mais freqüentemente encontradas nas fossas nasais de eqüinos) se desenvolviam normalmente em "SF Medium", iniciámos nosso trabalho segundo a técnica descrita na parte de material e método. Ao cabo de 209 exames, estranhámos os resultados totalmente negativos em relação a *Streptococcus equi* e um mínimo de 7 culturas positivas para *Streptococcus zooepidemicus*. Chamou-nos a atenção também a presença quase constante de estreptococos do grupo viridans. Pensámos numa possível interferência destes últimos no desenvolvimento das espécies hemolíticas e pudémos comprovar tal hipótese através de algumas provas comparativas que realizámos. Pelas provas efetuadas, parece-nos que o principal fator de interferência reside na alteração rápida do pH provocada pelo desenvolvimento exuberante dos estreptococos do grupo viridans, o que influi ou mesmo impede decididamente a multiplicação das espécies hemolíticas.

#### MATERIAL E MÉTODO

O material examinado proveio de eqüinos P.S.I. alojados na Vila Hípica do Jockey Club de São Paulo (nesse ambiente, LACERDA [1952] encontrou, em 314 animais, cêrca de 12% de portadores de estreptococos hemolíticos).

A coleta das amostras foi feita com mecha de algodão montada em estilete que era introduzida nas fossas nasais e friccionada na mucosa. No laboratório, o material era semeado em "SF Medium" e, após 24-48 horas de incubação a 37°C, as culturas eram repicadas em agar-sangue (5% de sangue de cavalo) para obtenção e reconhecimento de colônias. Seguiam-se as provas bioquímicas necessárias à identificação das amostras hemolíticas. Na nova etapa de coleta de material, passámos a utilizar três meios líquidos: "SF Medium", meio de LACERDA & FREITAS e caldo glicosado. A seqüência destes exames obedeceu às mesmas normas anteriores.

#### EXPERIÊNCIAS E RESULTADOS

1 — No quadro I apresentamos o comportamento do *St. equi*, *St. zooepidemicus* e *St. sp.* tipo viridans, quando cultivados isoladamente nos meios líquidos. O "inoculum" consistiu em uma alça (4 mm) de culturas de 24 horas em caldo glicosado. O resultado em placas de agar-sangue é expresso segundo o maior ou menor número de colônias desenvolvidas.

2 — No quadro II apresentamos o resultado obtido em placas de agar-sangue após semeadura simultânea de duas amostras de estreptococos em "SF Medium".

3 — No quadro III, a mesma prova anterior em meio L & F.

4 — No quadro IV, a mesma prova em caldo glicosado.

5 — No quadro V, apresentamos as variações do pH nos diversos meios com culturas simples e associadas.

6 — No quadro VI reunimos os resultados gerais obtidos nas 209 amostras semeadas unicamente em "SF Medium" comparados com aqueles obtidos com 193 amostras semeadas nos três meios líquidos.

Quadro I

Meio de cultura	Inoculum	24 horas a 37°C	Agar-sangue
"SF Medium"	<i>St. equi</i>		+
	<i>St. zooepid.</i>		+
	St. tipo virid.		++++
L & F	<i>St. equi</i>		++
	<i>St. zooepid.</i>		++
	St. tipo virid.		+++
Caldo glicosado	<i>St. equi</i>		+++
	<i>St. zooepid.</i>		+++
	St. tipo virid.		++++

Quadro II

Meio de cultura	Inoculum	24 horas a 37°C	Agar-sangue	
"SF Medium"	<i>St. equi</i>		<i>St. equi</i>	+
	<i>St. zooepidemicus</i>		<i>St. zooepidemicus</i>	+
	<i>St. equi</i>		<i>St. equi</i>	0
	St. tipo viridans		St. tipo viridans	++++
	<i>St. zooepidemicus</i>		<i>St. zooepidemicus</i>	0
	St. tipo viridans		St. tipo viridans	++++

Quadro III

Meio de cultura	Inoculum	24 horas a 37°C	Agar-sangue	
L. & F.	<i>St. equi</i>		<i>St. equi</i>	++
	<i>St. zooepidemicus</i>		<i>St. zooepidemicus</i>	++
	<i>St. equi</i>		<i>St. equi</i>	+
	<i>St. tipo viridans</i>		<i>St. tipo viridans</i>	++
	<i>St. zooepidemicus</i>		<i>St. zooepidemicus</i>	+
	<i>St. tipo viridans</i>		<i>St. tipo viridans</i>	++

Quadro IV

Meio de cultura	Inoculum	24 horas a 37°C	Agar-sangue	
Caldo glicosado	<i>St. equi</i>		<i>St. equi</i>	+++
	<i>St. zooepidemicus</i>		<i>St. zooepidemicus</i>	+++
	<i>St. equi</i>		<i>St. equi</i>	+
	<i>St. tipo viridans</i>		<i>St. tipo viridans</i>	++++
	<i>St. zooepidemicus</i>		<i>St. zooepidemicus</i>	+
	<i>St. tipo viridans</i>		<i>St. tipo viridans</i>	++++

Quadro V — \* Valor médio de 15 amostras.

Meio de cultura	pH inicial	Inoculum	24 horas a 37°C	pH *
"SF Medium"	6,9	<i>St. equi</i>		6,4
		<i>St. zooepidemicus</i>		6,3
		<i>St. tipo viridans</i>		4,7
L. & F.	7,0	<i>St. equi</i>		5,1
		<i>St. zooepidemicus</i>		5,0
		<i>St. tipo viridans</i>		4,8
Caldo glicosado	7,2	<i>St. equi</i>		5,0
		<i>St. zooepidemicus</i>		5,0
		<i>St. tipo viridans</i>		4,0

Quadro VI

Meio de cultura	Nº de amostras	<i>Streptococcus equi</i>	<i>Streptococcus zooepidemicus</i>
"SF Medium" .....	209	0	7
"SF Medium" .....	193	0	4
"L. & F." .....	193	18	33
Caldo glicosado .....	193	8	18

## DISCUSSÃO

Pelos resultados apresentados no quadro I observa-se que, de fato, o meio "SF" é menos favorável ao desenvolvimento de *St. equi* e *St. zooepidemicus* do que o meio "L & F" e que os estreptococos do tipo viridans desenvolvem-se melhor no primeiro. No quadro II demonstra-se que não há interferência entre amostras hemolíticas semeadas simultaneamente enquanto que a presença de estreptococos viridans impede a multiplicação de *St. equi* e *St. zooepidemicus*. Tal inibição torna-se menos acentuada no meio "L & F" (quadro III), permitindo o isolamento de amostras hemolíticas mesmo em presença de estreptococos viridans. Em caldo glicosado (quadro IV), a inibição é parcial como em "L & F". Tal meio, porém, não se presta para semeadura de material contaminado pois permite a vegetação exuberante de bactérias de contaminação. A influência do pH é bem definida no quadro V, onde se observa que o pH atingido em presença de estreptococos viridans é incompatível com a vida das amostras hemolíticas. Os resultados gerais do quadro VI mostram o valor prático das nossas observações, evidenciando nítida vantagem em relação ao meio "L & F", no isolamento de *St. equi* e *St. zooepidemicus* a partir de material contaminado.

## CONCLUSÕES

Pelo exposto parece-nos lícito concluir:

- a) o meio de LACERDA & FREITAS experimentado em 1952, confirmou suas propriedades favoráveis ao isolamento de *St. equi* e *St. zoo-*

*epidemicus* a partir de material contaminado, e não aconselhamos, portanto, qualquer modificação na sua fórmula;

b) o "SF Medium", em que pesem sua ótima composição e qualidades seletivas, não se comportou favoravelmente em relação aos estreptococos hemolíticos estudados, nas condições exigidas pelo trabalho;

c) parece-nos que esse comportamento desfavorável se deve à alteração rápida do pH que as amostras de estreptococos viridans (sempre presentes no tipo de material estudado), provocam no meio, através de intensa multiplicação, favorecida pela própria composição do "SF Medium".

#### SUMARIO

Realizando 209 exames de material proveniente de narinas de equinos, em "SF Medium", o autor estranha os resultados negativos obtidos em relação a *St. equi* e *St. zooepidemicus*. Faz então experiências comparativas com 193 amostras, utilizando três meios líquidos: "SF Medium", meio de LACERDA & FREITAS e caldo glicosado. Evidencia os melhores resultados obtidos com meio de LACERDA & FREITAS e sugere, através de provas realizadas, que o comportamento desfavorável do "SF Medium" se prende à rápida alteração do pH provocado por estreptococos do grupo viridans, sempre presentes nas fossas nasais dos equinos, e cuja vegetação é exuberante nesse meio.

#### SUMMARY

Using "SF Medium (Difco B 315)" and working with 209 samples of material from equines' nostrils the A. wonder at the negative results showed in relation to *St. equi* and *St. zooepidemicus*.

Then using three liquid media — "SF Medium", "Lacerda & Freitas" medium and glucose broth — made comparative tests with 193 new samples of the same nature.

Due to the circumstances of better results were showed when working with "Lacerda and Freitas" medium, the A. suggests that the not favorable behavior of "SF Medium" is tied to the fast change of the pH. It seems to the A. that these findings are induced by the growing up of viridans group streptococci which are normally present in equines' nostrils and whose luxurious growing up in such medium is very well known.

#### BIBLIOGRAFIA

- Difco Manual — 1953 — Ninth Edition. Difco Laboratories Inc. Detroit 1, Michigan
- EDWARDS, S. J. — 1933 — "Studies on bovine mastitis. IX — A selective medium for diagnosis of streptococcus mastitis". *Jour. Comp. Path. Therap.*, **46**(4): 211-17
- HARTMAN, G. — 1937 — "Ein Beitrag zur Reinzuchtung von Mastitis-streptokokken aus verunreinigen Material. *Milchw. Forsch.*, **118**:116-22. "cit." Lichstein, H. C. and Snyder, M. L. — 1941 — *Jour. Bact.*, **42**:653-64
- LACERDA JR., P. M. G. DE — 1951 — "Contribuição para o conhecimento da etiopatizootiologia da adenite eqüina (garrotilho)". *Tese. Fac. Med. Vet. Univ. São Paulo — São Paulo — Brasil*
- LACERDA JR., P. M. G. DE e FREITAS, D. C. DE — 1952 — "O emprêgo do nitrogeneto de sódio em meios seletivos para estreptococos — *Rev. Fac. Med. Vet.*, **4**(4): 553-57
- PACKER, R. A. — 1942 — "The use of sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) and crystal violet in a selective medium for streptococci. Master of Science degree thesis, Iowa State College. "cit." Merchant, I. A. — *Veterinary Bacteriology and Virology*: 94. 4th. ed. Ames. The Iowa State College Press. — 1950